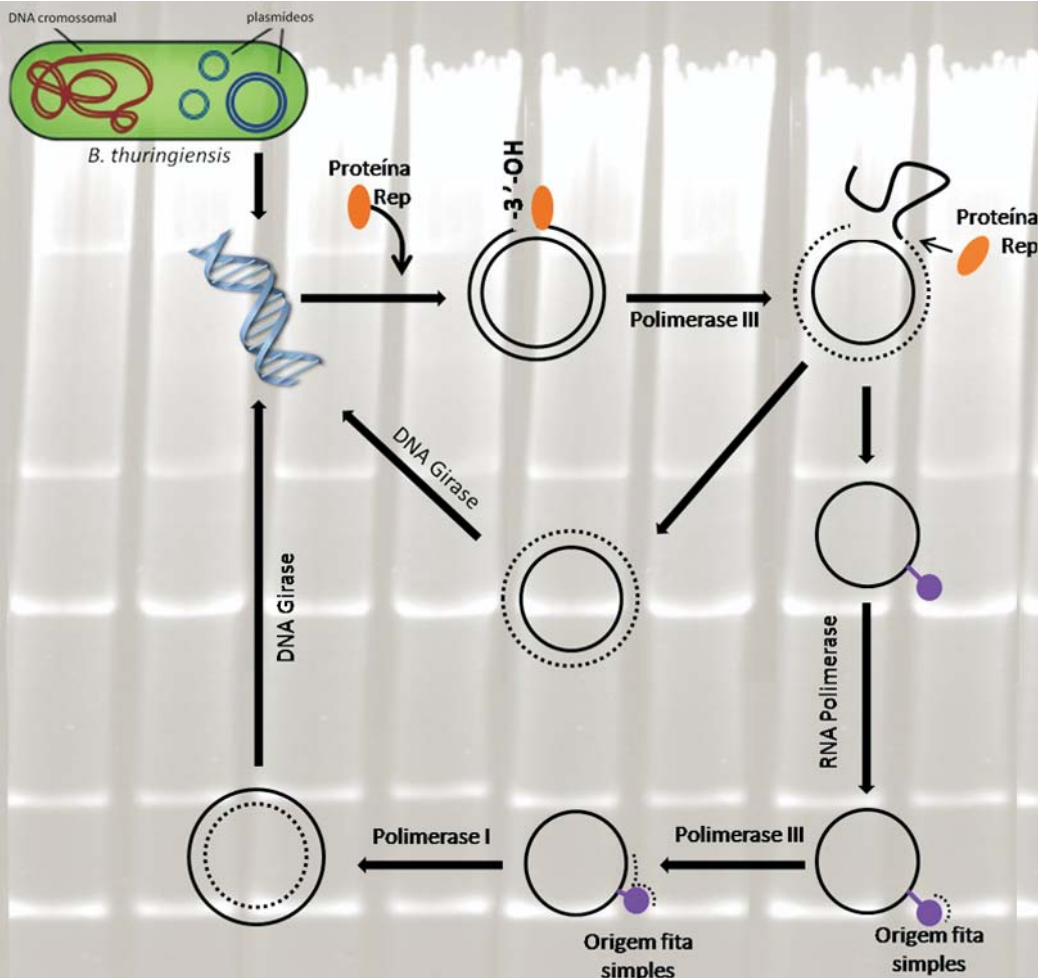


Plasmídios em *Bacillus thuringiensis*: tamanho, mecanismo de replicação e papel na atividade entomopatogênica



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agrobiologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 262

Plasmídios em *Bacillus thuringiensis*: tamanho, mecanismo de replicação e papel na atividade entomopatogênica

*Patrícia Gonçalves Galvão
Leona Henrique Varial de Melo
Patrícia de Medeiros Gitahy
Márcia Soares Vidal
Jean Luiz Simões Araújo
José Ivo Baldani*

Embrapa Agrobiologia
Seropédica, RJ
2009

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agrobiologia

BR 465, km 7, CEP 23.851-970, Seropédica, RJ

Caixa Postal 74505

Fone: (21) 3441-1500

Fax: (21) 2682-1230

Home page: www.cnpab.embrapa.br

E-mail: sac@cnpab.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: Norma Gouvêa Rumjanek

Secretária-Executiva: Carmelita do Espírito Santo

Membros: Bruno José Alves, Ednaldo da Silva Araújo, Guilherme

Montandon Chaer, José Ivo Baldani, Luis Henrique de Barros Soares

Revisão de texto: Stefan Schwab e Guilherme Montandon Chaer

Normalização bibliográfica: Carmelita do Espírito Santo

Tratamento de ilustrações: Maria Christine Saraiva Barbosa

Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

Foto da capa: Leona Varial e Patrícia Galvão

1ª edição

1ª impressão (2009): 50 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agrobiologia

P715

PLASMÍDIOS em *Bacillus thuringiensis*: tamanho, mecanismo de replicação e papel na atividade entomopatogênica. / Patrícia Gonçalves Galvão et. al. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2009. 31 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 262).
ISSN 1517-8498

1. Bactérias Gram-positivas. 2. Controle biológico. I. Melo, Leona Henrique Varial de. II. Gitahy, Patrícia de Medeiros. III. Vidal, Márcia Soares. IV. Simões-Araújo, Jean Luiz. V. Baldani, José Ivo. VI. Título. VII. Embrapa Agrobiologia. VIII. Série.

CDD 632.96

© Embrapa 2009

Autores

Patrícia Gonçalves Galvão

Doutoranda em Fitotecnia - UFRRJ, bolsita na Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 7, Seropédica, RJ, CEP 23890-000.

Leona Henrique Varial de Melo

Doutoranda em Biotecnologia Vegetal - UFRJ, bolsista na Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 7, Seropédica, RJ, CEP 23890-000.

Patrícia de Medeiros Gitahy

Analista/Gestão de laboratório - Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 7, Seropédica, RJ, CEP 23890-000.

Márcia Soares Vidal

Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 7, RJ, Seropédica, CEP 23890-000. E-mail: marcia@cnpab.embrapa.br.

Jean Luiz Simões Araújo

Pesquisador da Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 7, RJ, Seropédica, CEP 23890-000. E-mail: jean@cnpab.embrapa.br.

José Ivo Baldani

Pesquisador da Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 7, RJ, Seropédica, CEP 23890-000. E-mail: ibaldani@cnpab.embrapa.br.

Apresentação

As atitudes de usar com responsabilidade os recursos naturais (solo, água, ar, flora, fauna, energia), de preservar e conservar a natureza são cada vez mais necessárias para a sociedade moderna acarretando em uma busca constante por sistemas de produção agropecuários apoiados em princípios ecológicos e naturais.

Dentro desse cenário, a Embrapa Agrobiologia construiu o seu atual plano diretor de pesquisa, desenvolvimento e inovação (2008-2011) com a seguinte missão "gerar conhecimentos e viabilizar tecnologias e inovação apoiados nos processos agrobiológicos, em benefício de uma agricultura sustentável para a sociedade brasileira".

A série documentos 262 apresenta informações sobre o estudo de microrganismos potenciais para utilização na agricultura, mais especificamente, o *Bacillus thuringiensis* com aplicação no controle biológico de pragas em plantas cultivadas. O uso de ferramentas de genética molecular para o melhor entendimento do conteúdo genômico destes microrganismos é a abordagem do trabalho, que representa uma importante etapa da construção do avanço do conhecimento no desenvolvimento de produtos tecnológicos.

Eduardo Francia Carneiro Campello
Chefe Geral da Embrapa Agrobiologia

Sumário

Plasmídios em <i>Bacillus thuringiensis</i>: tamanho, mecanismo de replicação e papel na atividade entomopatogênica	9
O grupo <i>Bacillus cereus</i>	9
Características gerais de <i>Bacillus thuringiensis</i>	10
Perfil plasmidial em <i>Bacillus thuringiensis</i>	15
Tamanhos e mecanismos de replicação de plasmídeos	17
Plasmídeos com tamanho inferior a 15 MDa	17
Replicação através do mecanismo de ciclo-rolante (RCR)	19
Plasmídeos com tamanho superior a 15 MDa	21
Replicação através do mecanismo teta	23
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> estirpe S76: plasmídeos e seu potencial biotecnológico no controle de pragas	24
Referências Bibliográficas	26

Plasmídios em *Bacillus thuringiensis*: tamanho, mecanismo de replicação e papel na atividade entomopatogênica

Patrícia Gonçalves Galvão
Leona Henrique Varial de Melo
Patrícia de Medeiros Gitahy
Márcia Soares Vidal
Jean Luiz Simões Araújo
José Ivo Baldani

O grupo *Bacillus cereus*

Os membros do gênero *Bacillus* são amplamente utilizados como fontes de enzimas industriais, produtos bioquímicos, antibióticos e inseticidas (HARWOOD, 1992). *Bacillus cereus* (*stricto sensu*), *Bacillus anthracis* e *Bacillus thuringiensis* pertencem ao grupo de bactérias Gram-positivas, formadoras de esporo *Bacillus cereus* (*lato sensu*) (TOURASSE et al., 2006).

Bacillus cereus é uma bactéria de solo onipresente e um patógeno humano oportunista, gerando muitos problemas de contaminação nas indústrias de laticínios e fábricas de papel. Esta bactéria causa dois tipos de intoxicação alimentar, caracterizados tanto por diarreia e dor abdominal (síndrome diarréica) ou por náuseas e vômito (síndrome emética) (DROBNIEWSKI, 1993).

Bacillus anthracis é o agente causador do *anthrax*, uma doença que ocorre principalmente em mamíferos, incluindo o homem (MOCK e FOUET, 2001). A virulência de *B. anthracis* está relacionada com a presença de dois plasmídeos, pXO1 (181,7 Kb) e pXO2 (94,8 kb), cujas sequências de DNA foram determinadas recentemente (OKINAKA et al., 1999a; 1999b). Os esporos de *B. anthracis* são digeridos por herbívoros, que se tornam infectados. A bactéria prolifera nas glândulas linfóides, expressando concomitantemente as exotoxinas, que levam o animal à morte (JENSEN et al., 2003).

Bacillus thuringiensis (Bt) possui muito destaque dentro deste grupo devido a sua importância como agente de controle biológico, pois produz proteínas tóxicas a diferentes grupos de insetos, sendo utilizado industrialmente como biopesticida. A única diferença estabelecida entre *B. cereus* e *B. thuringiensis*, é a presença dos genes *cry*, que codificam essas proteínas tóxicas. Sem a presença desses genes as duas espécies de bactérias não podem ser distinguidas entre si (THORNE, 1993). *Bacillus thuringiensis* será discutido em detalhes no item 2.

Essas três espécies são tão similares geneticamente que comparações de sequências de DNA que codifica o RNA ribossomal 16S (ASH et al., 1991) ou regiões intergênicas para os RNAs ribossomais 16S-23S (DAFFONCHIO et al., 2000) não permitiram distinguir adequadamente os membros deste grupo. Suas relações taxonômicas e filogenéticas ainda estão em debate e não há um consenso se estas bactérias deveriam realmente estar classificadas como espécies separadas ou como variantes de uma única espécie (HELGASON et al., 2000; IVANOVA et al., 2003; READ et al., 2003; RASKO et al., 2005).

Atualmente, *Bacillus cereus* (*lato sensu*) constitui o grupo de bactérias intimamente relacionadas entre si com o maior número de DNAs genômicos (genomas) sequenciados (Tab. 1), o que representa grande oportunidade para estudos genômicos comparativos (TOURASSE et al., 2006). Entretanto, não há na literatura, descrição de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* com DNA genômico sequenciado, o que representa um grande desafio para as pesquisas devido à importância desta estirpe para o controle biológico.

Características gerais de *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria Gram-positiva e entomopatogênica, aeróbia ou facultativamente anaeróbia, em forma de bastonete, flagelada, formadora de esporo e ubíqua, encontrada em

Tabela 1. Genomas sequenciados do grupo *Bacillus cereus* (*lato sensu*).

Espécies/Estirpes	Status do Genoma	Tamanho (PB) *	Acesso no Genbank
<i>B. anthracis</i> A1055	12X shotgun	Chr. 5.370.618	AAEO00000000
<i>B. anthracis</i> Ames <i>Ancestor A0581</i>	Completo	Chr. 5.227.419 pXO1 181.677 pXO2 94.830	AE017334 AE017336 AE017335
<i>B. anthracis</i> Ames Florida A2012	12X shotgun	Chr. 5.222.293 pXO1 181.677 pXO2 94.829	AAAC01000001 AE011190 AE011191
<i>B. anthracis</i> Australia94 A0039	12X shotgun	Chr. 5.228.889	AAES00000000
<i>B. anthracis</i> CNEVA- 9066 A0402	12X shotgun	Chr. 5.211.737	AAEN00000000
<i>B. anthracis</i> Kruger B	12X shotgun	Chr. 5.197.923	AAEQ00000000
<i>B. anthracis</i> Sterne	Completo	Chr. 5.228.663 pXO1 181.654	AE017225 AF065404
<i>B. anthracis</i> Vollum A4088	12X shotgun	Chr. 5.214.542	AAEP00000000
<i>B. anthracis</i> Western North America USA6153 A0071	12X shotgun	Chr. 5.236.046	AAER00000000
<i>B. cereus</i> ATCC 10987	Completo	Chr. 5.224.283 pBc 10987 208.369	AE017194 AE017195
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	Completo	Chr. 5.411.809 pBClin15 15.274	AE016877 AE016878
<i>B. cereus</i> E33L (formerly <i>B. cereus</i> zebra killer)	Completo	Chr. 5.300.915 pE33L466 466.370 pE33L5 5.108 pE33L54 53.501 pE33L8 8.191 pE33L9 9.150	CP000001 CP000040 CP000041 CP000042 CP000043 CP000044
<i>B. cereus</i> G9241	12X shotgun	Chr. 5.936.496 pBCXO1 191.110 pBC218 218.094 pBClin29 29.886	AAEK00000000

Fonte: Tourasse et al. (2006).

Tabela 1. Genomas sequenciados do grupo *Bacillus cereus* (*lato sensu*). (continuação)

Espécies/Estirpes	Status do Genoma	Tamanho (PB) *	Acesso no Genbank
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> ATCC 35646	8X shotgun	Chr. 5.880.839	AAJM01000000
<i>Bacillus anthracis</i> Ames	Completo	Chr. 5.227.293	AE016879
<i>Bacillus anthracis</i> str. A0248	Completo	Chr. 5,227,419 nt PX02 - 95.000 pX01 - 180.000	CP001598 CP001597 CP001599
<i>Bacillus anthracis</i> str. Ames	Completo	Chr. 5,227,293 nt	AE016879
<i>Bacillus anthracis</i> str. 'Ames Ancestor'	Completo	Chr. 5.227.419 PX01 181.677 PX02 94.830	AE017334 AE017336 AE017335
<i>Bacillus anthracis</i> str. CDC 684	Completo	Chr. 5,230,115 nt pX02 - 95.000 pX01 - 180.000	CP001215 CP001214 CP001216
<i>Bacillus anthracis</i> str. Sterne,	Completo	Chr: 5,228,663 nt	AE017225
<i>Bacillus cereus</i> 03BB102	Completo	Chr. 5,269,628 nt p03BB102_179 - 180.000	CP001407 CP001406
<i>Bacillus cereus</i> AH187	Completo	Chr. 5,269,030 nt pAH187_12 - 120.000 pAH187_270 - 270.000 pAH187_45 - 45.000 pAH187_3 - 3.100	CP001177 CP001178 CP001179 CP001180 CP001181
<i>Bacillus cereus</i> AH820	Completo	Chr. 5,302,683 nt pAH820_3 - 3.100 pAH820_272 - 272.000 pAH820_10 - 11.000	CP001283 CP001284 CP001285 CP001286
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10987	Completo	Chr. 5.224.283 pBc10987 208.369	AE017194 AE017195

Fonte: Tourasse et al. (2006).

Tabela 1. Genomas sequenciados do grupo *Bacillus cereus* (*lato sensu*). (continuação)

Espécies/Estirpes	Status do Genoma	Tamanho (PB) *	Acesso no Genbank
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	Completo	Chr. 5.411.809 pBClin15 15.274	AE016877 AE016878
<i>Bacillus cereus</i> B4264	Completo	Chr. 5,419,036 nt	CP001176
<i>Bacillus cereus</i> E33L	Completo	Chr. 5.300.915	CP000001
		pE33L466 466.370	CP000040
		pE33L5 5.108	CP000041
		pE33L54 53.501	CP000042
		pE33L8 8.191	CP000043
<i>Bacillus cereus</i> G9842	Completo	pE33L9 9.150	CP000044
		Chr. 5,387,334 nt	CP001186
		pG9842_209 – 210.000	CP001187
		pG9842 140 – 140.000	CP001188
<i>Bacillus cereus</i> Q1	Completo	Chr. 5,214,195 nt	CP000227
		pBc239 – 240.000	CP000228
		pBc53 – 53.000	CP000229
<i>Bacillus cereus</i> subsp. <i>cytotoxis</i> NVH 391-98	Completo	Chr. 4,087,024 nt	CP000764
		pBC9801 – 7.100	CP000765
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>konkukian</i> str. 97-27	Completo	Chr. 5.237.682 pBT9727 77.112	AE017355 CP000047
<i>Bacillus thuringiensis</i> str. <i>Al Hakam</i>	Completo	Chr. 5,257,091 nt pALH1 – 56.000	CP000485 CP000486

Fonte: Tourasse et al. (2006).

diversos substratos naturais, como solo, plantas, água, fezes e carcaças de animais, grãos, produtos armazenados e nos insetos hospedeiros (FIÚZA, 2004). Pode consumir substratos variáveis devido à sua grande versatilidade metabólica (POLANCZYK e ALVES, 2003).

B. thuringiensis é um microrganismo saprófito, que não apresenta grandes requerimentos para o seu desenvolvimento, podendo adaptar-se a diferentes condições ambientais, sendo capaz de manter-se em latência sob a forma de

endósporos em condições adversas e produzir inclusões proteicas cristalinas, responsáveis pela atividade tóxica desta espécie contra grupos de invertebrados (SCHNEPF et al., 1998; GLARE e O'CALLAGHAM, 2000).

Esta bactéria foi descrita pela primeira vez em 1901 pelo bacteriologista japonês S. Ishiwata. Ele isolou um bacilo de larvas mortas de *Bombix mori* (bicho-da-seda) em uma fazenda e foi considerado o agente causador da *sotto-disease*. Entre 1909 e 1912, um bacilo similar foi isolado de lagartas da traça da farinha *Anagasta kuehniella*, por Berliner na Alemanha e, em 1915, homenageando a região onde as lagartas foram coletadas (Thuringen), o microrganismo foi descrito como *Bacillus thuringiensis*, confirmando ser a mesma bactéria isolada por S. Ishiwata em 1901 (GLARE e O'CALLAGHAM, 2000). Aoki e Chigasaki (1916) demonstraram que a sua atividade entomopatogênica era devido a uma toxina presente nas células esporuladas e ausente nas células vegetativas.

Bacillus thuringiensis pode ser encontrado nos mais diferentes habitats, estendendo-se dos árticos aos trópicos (MARTIN e TRAVERS, 1989). Embora a maioria das cepas originais tenha sido descoberta associada a insetos mortos (HEIMPEL e ANGUS, 1960), ou a resíduos de produtos estocados aonde os insetos eram abundantes (MEADOWS et al., 1992).

Sua atividade entomopatogênica logo despertou a atenção para a possibilidade de utilização de *B. thuringiensis* no controle biológico de insetos. A primeira tentativa de utilização de *B. thuringiensis* no controle de pragas foi realizada na França em 1938, quando se produziu a primeira formulação comercial denominada *Sporeïne*. A partir da década de 50, bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* foram desenvolvidos comercialmente por vários países. Estes inseticidas biológicos vêm sendo utilizados com sucesso há aproximadamente cinco décadas, principalmente para o controle de lepidópteros (SHARMA et al., 2000; SHELTON et al., 2002; POLANCZYCK et al., 2003).

Na década de 60, foi isolada uma estirpe de *B. thuringiensis* com toxicidade mais elevada contra os insetos da ordem Lepidoptera do que as estirpes

normalmente utilizadas nos produtos comerciais, sendo denominada *B. thuringiensis* subespécie *kurstaki*, conhecida como HD-1 (DULMAGE, 1970). E em 1970 foi lançado no mercado o Dipel®, bioinseticida à base desta estirpe que é comercializado até hoje (GLARE e O'CALLAGHAM, 2000).

A busca por novos isolados de *B. thuringiensis* com toxicidade mais alta é constante, visando à formulação de produtos comerciais efetivos para novos grupos de insetos. Várias coleções estão espalhadas pelo mundo e estima-se que existam cerca de 60.000 estirpes conhecidas, eficientes contra diversos insetos das ordens Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hemiptera, Hymenoptera, Homoptera, Isoptera, Mallophaga, Neuroptera, Orthoptera, Siphonaptera, Thysanoptera, além de outros grupos de invertebrados como nematóides, ácaros e protozoários (FEITELSON et al., 1992; SCHNEPF et al., 1998; GLARE e O'CALLAGHAM, 2000; POLANCZYK et al., 2003).

Quando os nutrientes disponíveis são abundantes, *B. thuringiensis* tem crescimento vegetativo, porém, quando ocorre diminuição no suprimento de alimento, esta bactéria pode manter-se em latência sob a forma de endósporos. Durante a fase de esporulação, essas bactérias sintetizam proteínas que se acumulam sob a forma de cristais em um dos pólos da célula, na periferia dos esporos (LERECLUS, 1988; HÖFTE e WHITELEY, 1989; PEFERÖEN, 1997). Estes cristais são compostos por uma ou várias proteínas Cry, também chamadas de delta-endotoxinas. Essas proteínas podem somar de 20 a 30% do peso seco da célula esporulada (ARONSON et al, 1982) e são altamente tóxicas e específicas (HERRERO et al., 2001; SIEGEL, 2001).

Perfil plasmidial em *Bacillus thuringiensis*

A maioria dos genes que codificam para delta-endotoxinas, os genes *cry* está localizada em grandes plasmídeos (GONZÁLES e CARLTON, 1982; GONZÁLES et al., 1982). Plasmídeos com mais de 50 MDa são comuns, mas algumas subespécies apresentam mais de 12 classes de tamanhos diferentes, variando de 1 MDa a mais de 150 MDa (CARLTON e

GONZÁLES, 1985; REYES-RAMÍREZ e IBARRA, 2008). Além disso, alguns isolados de Bt contêm mais de um gene *cry* (KRONSTAD et al., 1983) e seu espectro de ação depende das delta-endotoxinas individuais presentes no cristal de cada isolado (ESTRUCH et al., 1997).

O genoma de *B. thuringiensis* varia de 2,4 a 6,9 Mb (CARLSON et al., 1996) e contém cerca de 34% de G + C (KANEKO et al., 1978). O complexo perfil plasmidial, que pode representar entre 10 e 20% do DNA total de *B. thuringiensis*, tem sido estudado desde o final da década de 1970. Estudos realizados com estirpes de diversas subespécies revelaram a excepcional multiplicidade e diversidade dos elementos extracromossomais desse agente de controle biológico.

A diversidade e complexidade do espectro de atividade de *B. thuringiensis* podem ser justificadas pela mobilidade desses plasmídeos. A transferência destes plasmídeos entre as estirpes de *B. thuringiensis* pode ocorrer com alta frequência na natureza e em laboratórios, via conjugação, o que resulta em novas subespécies com diferente conteúdo plasmidial (THOMAS et al., 2000; 2001). Essa transferência também pode ocorrer entre espécies próximas como *B. cereus* e *B. anthracis* (GONZÁLES et al., 1982; LERECLUS et al., 1993; AUWERA et al., 2005) e até no interior das larvas infectadas (BATTISTI et al., 1985; JARRET e STEPHENSON, 1990).

Lereclus e colaboradores (1982) classificaram os plasmídeos de *B. thuringiensis* em dois grupos: pequenos plasmídeos de massa molecular inferior a 15 MDa e plasmídeos com massa molecular superior a 15 MDa. Estes dois grupos apresentam baixa relação molecular entre si, embora exista conservação, parcial ou total, de seqüências no interior de cada um dos grupos.

A maioria dos plasmídeos pequenos (< 15 MDa) sempre foi considerada crítica (sem função conhecida) uma vez que nenhuma função foi atribuída a eles; entretanto, a caracterização funcional de alguns plasmídeos de menor tamanho vem sendo relatada na literatura. As funções atribuídas a eles estão, principalmente, relacionadas ao processo de replicação e mobilização (SUN et al., 2000a; ANDRUP et al., 2003, ZHANG et al., 2007).

Tamanhos e mecanismos de replicação de plasmídeos Plasmídeos com tamanho inferior a 15 MDa

Em 1988, Lereclus e colaboradores clonaram dois plasmídeos pequenos de *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* LM2, denominados pHT1000 (8,6 Kb) e pHT1030 (15 Kb). Os autores relataram que ambos continham o transposon Tn4430 e o maior deles, pHT1030, também possuía o elemento de inserção *IS231* e um locus *spbA*, que garantia sua estabilidade segregacional (LERECLUS e ARANTES, 1992).

Mahillon e colaboradores (1988) clonaram e caracterizaram três pequenos plasmídeos (pGI1, pGI2 e pGI3) de *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* H1.1. Baseado nas análises do plasmídeo pGI1 de 8,2 Kb, cinco regiões abertas de leitura (ORFs) foram identificadas. Uma delas codifica para uma proteína Rep, responsável pela replicação autônoma do plasmídeo, outra codifica para uma proteína Mob, que permite a mobilização do plasmídeo, enquanto a ORF5 codifica para um regulador transcricional putativo. A ORF a jusante do gene *mob*, codifica para uma proteína que apresenta alto grau de similaridade com a toxina Doc do bacteriófago P1, enquanto a última ORF poderia codificar para seu antídoto (FICO e MAHILLON, 2006). Uma detalhada análise funcional realizada por Hoflack e colaboradores (1999) revelou a organização do plasmídeo pGI2, de 9,6 kb, que abriga o transposon Tn4430. Foram realizadas comparações das suas sequências indicando a presença de ORFs que codificam para proteínas Rep e Mob. Já o sequenciamento completo do DNA do plasmídeo pGI3 (11,3 kb) revelou 11 ORFs putativas; no entanto, após várias buscas em bancos de dados, não foram encontradas sequências similares a estas ORFs, com exceção de apenas uma, que apresentou similaridade com uma ORF de pSTK1, um plasmídeo críptico de 1,8 kb, isolado de *Bacillus stearothermophilus*. Após análises de deleção, os autores demonstraram que esta ORF codificava para uma proteína Rep (HOFLACK et al., 1997).

O plasmídeo pHD2 de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1-Dipel também foi sequenciado (MCDOWELL e MANN, 1991). Sua sequência de 2 Kb possui duas ORFs: o produto de uma delas apresenta considerável similaridade com um polipeptídeo RepA codificado pelo plasmídeo pLS1 e o produto da

outra exibe baixa homologia com uma topoisomerase codificada pelo plasmídeo pT181 de *Staphylococcus aureus*.

Três plasmídeos de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* também foram sequenciados: pTX14-1, pTX14-2 e pTX14-3. Diversos genes envolvidos com a replicação plasmidial foram identificados (MADSEN et al., 1993), tendo-se atribuído a esses plasmídeos funções de replicação e habilidade de transferência horizontal entre as espécies de *B. thuringiensis israelensis*. O plasmídeo pTX14-1 possui 5,2 Kb e 36% de bases C e G em seu conteúdo. Das 23 ORFs encontradas, apenas as três maiores apresentaram similaridades significativas com sequências conhecidas: o gene *rep14.1*, que codifica para uma proteína Rep, o gene *mob14-1*, que codifica para uma proteína Mob e um gene que codifica para uma proteína do tipo colágeno, *bcol14-1*. Já o plasmídeo pTX14-2 possui 6,8 Kb e 36% de bases G e C em seu conteúdo. Das 41 ORFs reveladas nenhuma mostrou similaridade com sequências previamente publicadas, exceto com funções envolvidas em replicação, mobilização e genes que codificam para proteínas do tipo colágeno (ANDRUP et al., 2003). A sequência de pTX14-3, de 7,6 Kb, foi determinada e analisada por Andrup e colaboradores (1994), que relataram que este plasmídeo carrega um gene que codifica para proteína Rep, e um gene *mob14-3*, que apresenta grande homologia com genes que codificam para proteínas de mobilização em outras bactérias Gram-positivas (ANDRUP et al., 1991).

As análises de sequências realizadas por Lopez-Meza e colaboradores (2003) revelaram que o plasmídeo pUIBI-1 de *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* possui 4,6 Kb e 32% de bases G e C em seu conteúdo. Este plasmídeo possui pelo menos sete ORFs putativas que codificam para proteínas variando de 5 a 50 KDa. A ORF1 codifica para uma proteína Rep de 16 KDa e a ORF2 codifica para uma proteína de 50 KDa, que apresenta homologia com proteínas Mob dos plasmídeos pLUB1000 de *Lactobacillus hilgardii* (32,2%) e pGI2 de *B. thuringiensis* (33,7%).

A estirpe YBT-1520 de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* contém pelo menos sete plasmídeos (SUN et al., 2000a), sendo que dois deles, os plasmídeos

pBMB2062 e pBMB9741, já foram sequenciados. O pequeno plasmídeo pBMB2062 foi clonado e sequenciado por Sun e colaboradores (2000b). Sua sequência de 2 Kb contém duas ORFs putativas que codificam para proteínas de replicação. O plasmídeo pBMB9741, de 6,6 Kb foi clonado, sequenciado e caracterizado por Zhang e colaboradores (2007). Doze ORFs foram identificadas e as análises através do programa BLAST indicaram que três delas codificam para proteínas envolvidas na mobilização conjugativa, iniciação da replicação e regulação transcricional.

O plasmídeo pBMB175 de *B. thuringiensis* subsp. *tenebriosis* YBT-1765 também foi sequenciado (HAN et al., 2005; HUANG et al., 2007). As análises das sequências mostraram que pBMB175 possui 14,8 Kb e 31 % de bases G e C em seu conteúdo. Das 18 ORFs putativas encontradas, nove apresentaram homologia com proteínas hipotéticas do plasmídeo pGI3 de *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* H1.1.

Replicação através do mecanismo de ciclo-rolante (RCR)

A classificação de plasmídeos, em termos de tamanho, está de acordo com a descrição sobre a replicação de plasmídeos de bactérias Gram-positivas (GRUSS e ERLICH, 1989). Estes autores demonstraram que em Gram-positivas os plasmídeos de massas moleculares menores replicam via mecanismo do ciclo-rolante, estando presentes em alto número de cópias, geralmente vinte cópias por cromossoma (BRUAND et al., 1991; KHAN, 1997). Neste modelo, a proteína de replicação (Rep) introduz um corte na origem de replicação fita dupla (*dso* - *double-strand origin*), gerando uma terminação 3'-OH. A partir desta terminação livre ocorre a extensão até que toda a fita parental seja substituída. Logo, quando a forquilha de replicação alcança o *dso* reconstituído, uma molécula de DNA fita dupla, com a fita parental e a nova fita sintetizada e uma molécula intermediária de DNA fita simples são liberadas. A proteína Rep liga as extremidades da molécula de fita simples de DNA (ssDNA), a qual é detectada como uma molécula livre. Imediatamente, este DNA intermediário de fita simples é transformado em uma molécula de fita dupla, começando a partir de uma segunda origem, a origem de replicação fita simples (*sso* - *single-strand origin*). A nova fita é sintetizada por uma DNA polimerase a partir de um

Tabela 2. Classificação de alguns plasmídeos de *Bacillus thuringiensis* que se replicam via mecanismo do ciclo rolante. Adaptado de Andrup et al. (2003).

Grupos	Plasmídeos	Referências
Grupo I	pHD-3a3b	Marin et al., 1992
	pHD 2	McDowell e Mann, 1991
	pBMB2062	Sun et al., 2000b
Grupo III	pBMB9741	Zhang et al., 2007
	pGI1	Hoflack et al., 1999
	pTX14-1	Andrup et al., 2003
Grupo VI	pGI3	Hoflack et al., 1999
Grupo VII	pGI2	Hoflack et al., 1999
	pTX14-2	Andrup et al., 2003
	pTX14-3	Andrup et al., 1994

pequeno iniciador sintetizado pela RNA polimerase do hospedeiro. Os produtos finais são moléculas de DNA plasmidial super-enoveladas (*supercoiled*) (DEL SOLAR et al., 1998).

Os plasmídeos que se replicam através do mecanismo de ciclo rolante foram agrupados em 17 grupos, baseado nas similaridades das proteínas de replicação (OSBORN, 2000a). A classificação de alguns dos plasmídeos de *B. thuringiensis* que se replicam por este mecanismo está disposta na Tab. 2.

Embora a maioria dos plasmídeos de baixo peso molecular de *B. thuringiensis* seja classificada como RCR, até pouco tempo atrás não havia nenhum registro sobre a presença de genes *cry* nesses plasmídeos. Os genes *cry* sempre foram encontrados em plasmídeos de alto peso molecular, que duplicam seu material através de mecanismo teta (θ), contudo, em 2005, Loeza-Lara e colaboradores (2005) clonaram e analisaram a sequência do plasmídeo pBMBt1 de 6,7 Kb de *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadensis*. Ele apresenta todas as características de plasmídeos que se replicam por mecanismo de ciclo-rolante, sugerindo

ser um plasmídeo com replicação do tipo RCR. No entanto, pBMBt1 contém três ORFs putativas, sendo que duas delas codificam para proteínas Rep e Mob, e a terceira, denominada *cry 14-4*, apresenta alto grau de identidade de sequências de aminoácidos com as proteínas inseticidas Cry15Aa (21,9%) e Cry C53 (24,6%) de *Bacillus thuringiensis* subsp. *thompsoni* e *B. thuringiensis* subsp. *cameroun*, respectivamente. Este foi o primeiro relato de um plasmídeo RCR de *Bacillus thuringiensis* que codifica para uma proteína inseticida cristal.

Plasmídeos com tamanho superior a 15 MDa

A literatura mostra que os genes *cry* estão presentes nos plasmídeos com massa molecular superior a 15 MDa e que contêm em sua sequência, frequentemente, elementos genéticos móveis, como sequências de inserção (*/S*) e transposons. Esta organização parece favorecer a mobilidade dos genes *cry*, e o surgimento de estirpes com novas especificidades inseticidas (LERECLUS et al., 1993; MAHILLON et al., 1994; SCHNEPF et al., 1998; BERRY et al., 2002; CHAO et al., 2007).

As diversas subespécies de *B. thuringiensis* apresentam um ou diversos genes de toxinas em um ou diferentes replicons. As estirpes podem conter de um até cinco genes *cry* diferentes. As bactérias HD-1 e S76 de *B. thuringiensis* subespécie *kurstaki*, por exemplo, contêm os genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry2Aa* e *cry2Ab* (GITAHY et al., 2007). O gene *cry1Ab* desta subespécie parece estar presente em um plasmídeo com cerca de 44 MDa (pBt44), enquanto os genes *cry1Aa* e *cry1Ac* normalmente estão localizados em um plasmídeo de 110 MDa (pBt110) (HÖFTE e WHITELEY, 1989).

Berry e colaboradores realizaram um trabalho pioneiro em 2002 quando sequenciaram o primeiro megaplasmídeo de *B. thuringiensis*. Este plasmídeo de 127,9 Kb, denominado pBtoxis, foi isolado de uma estirpe da subespécie *israelensis*. Em sua sequência, foram encontrados quatro genes *cry* (*cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa* e *cry11Aa*) e dois genes *cyt* (*cyt1Aa* e *cyt2Ba*). Além desses genes, o pBtoxis também contém pequenas sequências que codificam para fragmentos de toxinas. Por exemplo, as ORFs pBt025 e pBt026 codificam para dois segmentos que apresentam homologia com a região

central da toxina do tipo Cry28Aa, enquanto pBt053 parece codificar para uma sequência que apresenta homologia com a extremidade C-terminal de uma proteína do tipo Cry26Aa (WOJCIECHOWSKA et al., 1999). Mais de 23% dos genes de pBtoxis apresentam similaridade com genes relacionados a transposons, indicando a ocorrência de uma quantidade considerável de troca de DNA na história evolucionária de pBtoxis.

Análises deste plasmídeo também revelaram vários outros genes que podem apresentar efeitos significativos em diversos aspectos do fenótipo do organismo hospedeiro. A maioria deles pode estar envolvida em funções ligadas à esporulação e germinação. Além disso, também foram observadas sequências que codificam para duas proteínas regulatórias (P19 e P20), com possível papel na formação do cristal e aumento da viabilidade celular, atuando como chaperonas. Um *operon* possivelmente envolvido na produção e exportação de um antibiótico peptídico também foi identificado. A presença de todos esses genes indica que pBtoxis deve exercer influência considerável nos processos de esporulação e germinação de seu hospedeiro.

Em 2004, o único plasmídeo (pBt9727) de *B. thuringiensis* serovar *konkukian* str. 97-27 foi sequenciado. Sua sequência de 77,1 Kb está depositada no Genbank (número de acesso: CP000047), contudo as análises de sua sequência ainda não foram descritas.

Além de pBMB9741 (6,5 Kb) e pBMB2062 (2 Kb), outro plasmídeo presente em *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* YBT-1520 foi sequenciado (CHAO et al., 2007). Nesse trabalho, os autores descreveram a sequência completa de nucleotídeos do plasmídeo de 67 Kb, denominado pBMB67. Das 74 ORFs identificadas, 25 (34%) apresentam funções putativas, 18 (24%) codificam para proteínas hipotéticas conservadas e 31 (42%) codificam para proteínas que não apresentam homologia com aquelas presentes em banco de dados. Entre as cinco ORFs consideradas como elementos regulatórios putativos, as ORF16 e ORF17 estão organizadas como um possível *operon* cuja estrutura faz lembrar os cassetes Rap-Phr de *Bacillus subtilis*, que estão envolvidos com sinalização célula a célula e

regulação transcricional. A ORF18 parece codificar para um homólogo da chaperona Hfq, mediadora das interações entre pequenos RNAs regulatórios e RNAs mensageiros específicos (GEISSMANN e TOUATI, 2004). Entre os elementos móveis encontrados neste plasmídeo estão o transposon TN4430 e os elementos de inserção *IS231C* e *IS232A*.

Os autores também descreveram uma região de transferência (*tra*) de 39 Kb com 41 ORFs putativas, das quais pelo menos nove parecem estar envolvidas com conjugação. Nesta região, também foram encontradas dez genes que codificam para proteínas de membrana e/ou de secreção, que devem compor algumas estruturas de superfície celular que são importantes para a conjugação deste plasmídeo.

Um replicon de 2,8 Kb contendo o gene que codifica para uma proteína Rep e sua correspondente origem de replicação apresentou 100% de identidade com o gene correspondente no plasmídeo p43 (65 Kb) de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD263 (BAUM e GILBERT, 1991). Portanto, assim como p43, o plasmídeo pBMB67 pode ser classificado como um membro da família pAM β 1 de plasmídeos que se replicam por meio de mecanismo teta.

Replicação através do mecanismo teta

De maneira geral, os plasmídeos de *B. thuringiensis* de massa molecular superior a 15 MDa replicam pelo mecanismo teta e estão presentes em baixo número de cópias, geralmente, duas a cinco cópias (WILCKS, et al., 1999). A replicação através do mecanismo teta envolve a desnaturação das fitas molde, síntese de um RNA iniciador e o início da síntese por extensão covalente a partir deste iniciador. A síntese do DNA é contínua em uma das fitas, e descontínua na fita complementar, embora a síntese, em ambas, parece estar conectada. A síntese através do mecanismo teta pode iniciar a partir de uma ou várias origens, e a replicação pode ser tanto unidirecional quanto bidirecional. Com algumas exceções, a iniciação da replicação de plasmídeos através do mecanismo teta requer uma proteína iniciadora Rep específica, devido à presença de sequências específicas nas origens de replicação, nas quais a proteína Rep interage (DEL SOLAR et al., 1998). Essa estratégia de replicação promove maior estabilidade estrutural,

contrapondo à replicação pelo ciclo rolante, que conduz a uma forte instabilidade das moléculas (BRUAND et al., 1991).

Os plasmídeos que replicam através do mecanismo teta são normalmente divididos em seis grupos (OSBORN, 2000b). Existem poucos estudos caracterizando os plasmídeos de bactérias Gram-positivas que replicam através deste mecanismo.

***Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* estirpe S76: plasmídeos e seu potencial biotecnológico no controle de pragas**

A estirpe de *B. thuringiensis* subespécie *kurstaki*, denominado estirpe S76 (*Btk* S76), depositada no Banco de Germoplasma Microbiano da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, foi selecionada e caracterizada pela Embrapa Agrobiologia com o intuito de diminuir os danos na cultura de cana-de-açúcar provocados pela broca (*Diatraea saccharalis*). Em bioensaios foi observado que a mesma foi dez vezes mais tóxica para a broca da cana do que a bactéria HD-1 da mesma subespécie, utilizada como padrão comercial para lepidópteros (GITAHY, 2000). Além disso, o estudo demonstrou a presença dos genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry2Aa1* e *cry2Ab2*, sugerindo que as toxinas codificadas por estes genes, ou a combinação delas, podem ser responsáveis pela alta mortalidade provocada por esta estirpe às larvas da broca da cana-de-açúcar (GITAHY et al, 2007). Sabe-se que o gene *cry1Ab* de *B. thuringiensis kurstaki* está presente em um plasmídeo com cerca de 44 MDa, enquanto os outros genes tipos *cry1* (*cry1Aa* e *cry1Ac*) estão localizados em um plasmídeo de 110 MDa (HÖFTE e WHITELEY, 1989). Não se sabe nada a respeito desses e dos demais plasmídeos (cerca de 10) presentes nesta estirpe. É provável que esses plasmídeos devam possuir papel importante na biologia desta estirpe, inclusive com alguma participação no seu efeito inseticida (GITAHY et al., 2007). Além disso, poucos estudos caracterizando os plasmídeos de *B. thuringiensis*, principalmente os maiores, foram realizados até o momento. Como as funções destes plasmídeos não podem ser

determinadas através dos fenótipos da estirpe hospedeira, a melhor maneira de estudá-los é através do sequenciamento dos plasmídeos e investigando a função de seus genes.

Uma estratégia que se tem mostrado bastante viável é o uso da técnica de sequenciamento em larga escala como o da Illumina Sollexa que gera milhões de pequenas sequências do tamanho de 35pb (HERNANDEZ et al., 2008). A mesma é mais flexível, cerca de 10 a 20 vezes mais barata que o sequenciamento convencional além de permitir a análise de milhares de amostras por dia (SCHUSTER, 2008). Os equipamentos hoje disponíveis geram sequências pequenas, mas em quantidade suficientes para cobrir mais de 90% do DNA alvo, tornando assim vantajoso no caso de sequenciamento de plasmídeos como aqueles presentes na estirpe *Bt* S76. Pesquisa em andamento na Embrapa Agrobiologia busca a obtenção da sequência do DNA genômico da estirpe *Bt* S76 através da técnica de sequenciamento em larga escala.

O conhecimento sobre o conteúdo genômico (plasmidial e cromossomal) da estirpe *Bt* S76 permitirá determinar o tamanho exato e o modo de replicação dos plasmídios presentes na bactéria. Além disso, constituirá numa fonte de genes que poderão ter aplicação tanto na área farmacêutica e industrial, como na agricultura, através da expressão heteróloga de genes de interesse em bactérias ou plantas tais como o milho e a cana-de-açúcar.

Referências Bibliográficas

ANDRUP, L.; DAMGAARD, J.; WASSERMANN, K. Identification of a gene (mob 14-3) encoding a mobilization protein from the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* plasmid pTX14-3. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 19, p. 2780, 1991.

ANDRUP, L.; JENSEN, G. B.; WICKS, A.; SMIDT, L.; HOFLACK, L.; MAHILLON, J. The patchwork nature of rolling-circle plasmids: comparison of six plasmids from two distinct *Bacillus thuringiensis* serotypes. **Plasmid**, San Diego, v. 49, p. 205-232, 2003.

AOKI, K.; CHIGASAKI, Y. Bacterial insecticides. **Bacteriological Reviews**, Baltimore, v. 24, p. 266-288, 1916.

ARONSON, A. I.; TYRELL, D. J.; FITZ-JAMES, P. C.; BULLA JR., L. A. Relationship of the syntheses of spore coat protein and parasporal crystal protein in *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 151, p. 399-410, 1982.

ASH, E.; FARROW, J. A. E.; WALLBANKS, S.; COLLINS, M. D.

Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit ribosomal RNA sequences. **Letters in Applied Microbiology**, Oxon, v. 13, p. 2002-2006, 1991.

AUWERA, V. D.; ANDRUP, L.; MAHILLON, J. Conjugative plasmid pAW63 brings new insights into the genesis of the *Bacillus anthracis* virulence plasmid pXO2 and of the *Bacillus thuringiensis* plasmid pBT9727. **BMC Genomics**, London, v. 6, p. 103, 2005.

BATTISTI, L.; GREEN, B. D.; THORNE, C. B. Mating system for transfer of plasmid among *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 162, p. 543-550, 1985.

BAUM, J. A.; GILBERT, M. P. Characterization and comparative sequence analysis of replication origins from three large *Bacillus thuringiensis* plasmids. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p. 5280-5289, 1991.

BERRY, C.; O'NEIL, S.; BEN-DOV, E.; JONES, A. F.; MURPHY, L.; QUAIL, M. A.; HOLDEN, M. T.; HARRIS, D.; ZARITSKY, A.; PARKHILL, J. Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 5082-5095, 2002.

BRUAND, C.; EHRLICH, S. D.; JANNIERE, L. Unidirectional replication of the structurally stable *Enterococcus faecalis* plasmid pAM β 1. **EMBO Journal**, v. 10, p. 2171-2177, 1991.

CARLSON, C. R.; JOHANSEN, T.; LECADET, M-M.; KOLSTØ. Genomic organization of the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* subsp. *Berliner 1715*. **Microbiology**, New York, v. 142, p. 1625-1634, 1996.

CARLTON, B. C.; GONZÁLEZ JÚNIOR., J. M. The genetics and molecular biology of *Bacillus thuringiensis*. In: DUBNAU, D. A. **The molecular biology of the bacilli**. New York: Academic Press, 1985. v. 2. p. 211-249.



Agrobiologia



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

